

بیماریزایی و تنوع ژنتیکی استرین‌های *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* عامل بیماری پژمردگی یونجه در استان همدان

علی حیدری^۱ و غلام خداکرمیان^{۲*}

۱، ۲، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۱۸ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۰/۲۴)

چکیده

یونجه (*Medicago sativa*) از گیاهان مهم علوفه‌ای و استان همدان منطقه‌ای مناسب برای رشد آن است. پژمردگی باکتریایی یونجه که توسط *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* ایجاد می‌شود، یکی از بیماری‌هایی است که سبب کاهش محصول در این استان می‌شود. این بیماری تاکنون به صورت جامع در استان همدان مورد بررسی قرار نگرفته است. در این بررسی از مناطق مختلف یونجه‌کاری استان همدان نمونه‌برداری و باکتری عامل بیماری پژمردگی جدا شد. بیماریزایی استرین‌های جدا شده روی یونجه تحت شرایط گلخانه با سه تکرار تایید شد. استرین‌های مورد بررسی پس از گذشت ۴۰ روز در بوته‌ها علائم بیماری را ایجاد کردند. با بررسی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های عامل بیماری پژمردگی یونجه به عنوان *C. m. subsp. insidiosus* تشخیص داده شدند. تأثیر استرین‌های جدا شده بر طول ساقه و ریشه، و وزن تر و خشک بوته‌های آلوده در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار ارزیابی شد. داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS و آزمون دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استرین‌های مورد بررسی سبب کاهش شاخص‌های طول و وزن بوته‌های یونجه شده و از نظر تأثیر روی کاهش این شاخص‌ها با هم تفاوت معنی‌دار دارند. برای بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای تصادفی Opa-03، Opa-15، Opa-10، Ope-01، Ope-02، Ope-03، Ope-04، Ope-07، Ope-14، Ope-15، Ope-18، Ope-20، Ope-19 و Ope-16 به کار رفت و خوشه‌بندی انجام شد. بر مبنای این روش استرین‌های مورد بررسی چهار کلاستر تشکیل دادند. استرین‌های AH7، AH8، AH9 و AH6 در یک کلاستر، AH15 و AH2 در کلاستر دوم، AH10، AH11، AH12 و AH14 در کلاستر سوم و AH1 و AH3 در کلاستر چهارم قرار گرفتند. با هضم قطعه تکثیر شده با پرایمرهای CIRS-1 و CIRS-2 توسط آنزیم *EcoRI* استرین‌های مورد بررسی دو گروه شامل استرین‌های AH1، AH2، AH3، AH7، AH8، AH11، AH12 و AH15 با داشتن دو باند و استرین‌های AH6، AH10 و AH14 با دارا بودن تنها یک باند را تشکیل دادند. داده‌های به دست آمده تنوع ژنتیکی استرین‌های *C. m. subsp. insidiosus* را در استان همدان نشان داد.

واژه‌های کلیدی: *Clavibacter michiganensis* subsp. *Insidiosus*، RAPD، PCR-RFLP.

پژمردگی باکتریایی یونجه، تنوع ژنتیکی

مقدمه

یونجه گیاهی چند ساله یا دائمی و یکی از مهمترین منابع تامین علوفه است. این گیاه به علت کیفیت مناسب و خوشخوراکی و همچنین داشتن ذخائر غذایی مانند مواد معدنی، مواد پروتئینی و ویتامین‌های A و C اهمیت ویژه پیدا کرده است. این گیاه از راه تهویه خاک، پایین بردن آب سطح‌الارضی (زهکشی)، افزایش مواد آلی و ازدیاد ازت خاک، تأثیر مهمی در اصلاح زمین دارد. بهترین اقلیم کشت یونجه مناطق با آب و هوای حاره‌ای سرد و تابستان‌های گرم و خشک هستند. استان همدان به دلیل داشتن اقلیم مناسب، یکی از نواحی مستعد برای رشد و نمو رویشی و زایشی یونجه است. بنابر گزارش مرکز آمار ایران، سطح زیر کشت یونجه در ایران در سال ۱۳۸۴، ۶۱۶۱۰۶/۲ هکتار بوده که استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، زنجان، همدان، اصفهان و مرکزی دارای بیشترین سطح زیر کشت این محصول هستند. میزان تولید سالیانه یونجه در ایران ۴۷۶۲۳۹۱ تن است. در استان همدان، سطح زیر کشت این محصول ۴۲۰۹۶/۵ هکتار و تولید سالانه آن، ۴۷۷۶۲۹/۳۸ تن است که از این نظر پس از استان‌های آذربایجان شرقی و غربی در رتبه سوم قرار دارد. یکی از بیماری‌های مهم یونجه پژمردگی باکتریایی است. عامل این بیماری *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* است که اولین بار از ایالت‌های شمالی آمریکا شامل ایلینوی شمالی و ویسکانسین گزارش شد (McCulloch, 1925). منشأ بیماری آمریکای شمالی است و از آنجا به قاره‌های دیگر انتقال یافته است ولی تاکنون از کشورهای چک، یونان، ایرلند، ایتالیا، لهستان، رومانی، روسیه، تونس، اوکراین، یوگسلاوی، عربستان سعودی، ترکمنستان، آفریقای جنوبی، تونس، کانادا، مکزیک، آمریکا (آلاسکا، کالیفرنیا، مریلند، مینسوتا، اوکلاهاما و اورگون)، برزیل، شیلی، استرالیا و نیوزیلند گزارش شده است. تنوع ژنتیکی استرین‌های باکتری عامل بیماری توسط Burokiene et al. (2005) بررسی شده است اما تفاوت در بیماری‌زایی تا کنون گزارش نشده است. در ایران نیز گزارشی از تنوع ژنتیکی و تفاوت در بیماری‌زایی منتشر نشده است ولی بیماری از استان‌های همدان و فارس گزارش شده است. باکتری

عامل بیماری در ارقام حساس یونجه سه ساله یا بیشتر بسیار مخرب است. بارزترین ویژگی گیاهان بیمار کوتاهی قد و وجود غیرعادی ساقه‌های فراوان است که حالت جاروی جادوگر به گیاه می‌دهد (Stuteville & Erwin, 1990). این باکتری از طریق زخم‌ها وارد گیاه شده و باعث تخریب فیزیکی آوندهای آبکشی می‌شود. آلودگی گیاهان معمولاً در هوای مرطوب و سرد در بهار و اوایل تابستان اتفاق می‌افتد (Samac et al., 1998). روش‌های مبتنی بر DNA، به ویژه روش‌هایی که از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده می‌کنند، توصیف دقیقی از تنوع ژنتیکی پاتوژن‌ها و روابط فیلوژنتیکی آنها را امکان‌پذیر کرده‌اند (Henson & French, 1993). روش RAPD که انگشت نگاری اسید نوکلئیک بر پایه تکثیر است و واکنشی است که در شیشه جدا از موجود زنده انجام می‌شود (Micheli et al., 1994). روش انگشت‌نگاری RFLP به عنوان روشی حساس و دقیق برای تشخیص موجودات زنده از جمله باکتری‌ها در حد نژاد به کار گرفته می‌شود و می‌تواند استرین باکتریایی زیادی را مورد بررسی قرار دهد (Babalola, 2003). از آنجا که بیماری پژمردگی یونجه در همدان شیوع داشته و تاکنون بررسی جامعی در این مورد انجام نشده است، هدف از این بررسی تعیین میزان بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی استرین‌های باکتری *C. m. subsp. insidiosus* عامل بیماری پژمردگی یونجه است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی استرین‌های باکتری عامل بیماری
بوته‌های یونجه مشکوک به آلودگی از مناطق مهم کشت این گیاه در استان همدان شامل اطراف همدان، فامنین، ملایر، اسدآباد و نهاوند به صورت تصادفی با حرکت زیگزاگی در مزرعه گردآوری شدند. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه سطح ساقه و ریشه ابتدا با اتانول ۹۵٪ و سپس هیپوکلریت سدیم ۵٪ ضدعفونی شدند. نمونه‌ها پس از شستشو با آب استریل قطعه قطعه و در آب مقطر استریل به مدت یک ساعت غوطه‌ور گردیدند (Burr & Katz, 1983). سوسپانسیون مربوطه روی محیط کشت نوترینت آگار دارای ۵٪ عصاره مخمر کشت

یونجه اندازه‌گیری شد. داده‌های به دست آمده توسط نرم افزار SAS و با روش دانکن مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

بررسی‌های مولکولی

استخراج DNA باکتریایی توسط بافر TE و با روش جوشاندن انجام شد و DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Ausubel *et al.*, 2002). برای انجام آزمایش RAPD از آغازگرهای تصادفی Ope02، Opa-03، Opa-15، Opb-10، Opb-، Ope-03، Ope-02، Ope-01، Opb-20، Opb-18، Ope-04، Ope-07، Ope-14، Ope-16، Ope-19 و Ope-02 ساخت شرکت متابیون (METABION COMPANY) استفاده شد (Burokien *et al.*, 2005). واکنش PCR در بافر ۱X، ۲/۵ μl، MgCl₂ (غلظت نهایی ۲/۵ Mm)، dNTPs (غلظت نهایی ۰/۲ Mm)، پرایمر (غلظت نهایی ۲۵ pmol)، ۲/۵ μl، آنزیم Taq DNA polymerase (غلظت نهایی ۲۵ pmol) و آب مقطر دیونیز ۱۵/۵ μl و DNA استخراج شده ۱ μl انجام شد. ۴۰ چرخه PCR با برنامه واسرشت در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۳۶ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌ها، از روش PCR-RFLP با آغازگرهای CIRS-1 (5'-TTCAACCGCACCCCTCGCGAC-3') و CIRS-2 (5'-CGTCAGCCCCGTGGCTCGAGT-3') استفاده شد. این پرایمرهای بخش IS با نام IS1121 تکثیر کرده که در ژنوم باکتری *C. m. subsp. insidiosus* تعداد ۳۳ کپی از آن وجود دارد (Samac *et al.*, 1998). به محلول واکنش PCR ترکیب DMSO (با غلظت نهایی ۲/۵ Mm) ۱ μl نیز اضافه شد. تعداد ۳۰ چرخه PCR با برنامه واسرشت در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه انجام شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول به دست آمده، با آنزیم برشی *EcoRI* در دمای ۳۷ درجه

و مدت ۵-۶ روز نگهداری شد. کلنی‌های منفرد زرد تا نارنجی رنگ انتخاب و با کشت روی محیط بالا خالص-سازی گردیدند. استرین‌های خالص شده برای بررسی بیشتر در گلیسرول ۱۰٪ و همچنین یخچال نگهداری شدند.

مقایسه پروتئین‌های محلول سلولی استرین‌های باکتریایی

پس از اثبات بیماریزایی استرین‌های جدا شده (Samac *et al.*, 1998)، برای انتخاب نماینده‌های آنها به منظور انجام آزمون‌های فنوتیپی و گلخانه‌ای، الگوی پروتئین‌های محلول سلولی آنها در ژل پلی‌آکریل آمید به روش اصلاح شده Laemmli (1970) انجام و مقایسه شد. مقدار ۱/۰٪ لایوزایم به بافر استخراج پروتئین اضافه گردید و الکتروفورز پروتئین‌های استخراج شده در ژل پلی‌آکریل‌آمید عمودی با ژل جدا کننده ۱۲٪ و ژل نگهدارنده ۵٪ انجام شد.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های باکتری

آزمون‌های هیدرولیز اسکولین، کازئین و نشاسته، تولید لوان، تولید اسید از ریبوز، سوربیتول و اینولین، استفاده از فومارات و استات، اوره‌آز، کاتالاز، رشد در محیط کشت حاوی TTC و رنگ آمیزی گرم به روش Schaad *et al.* (2001) انجام شد. فعالیت اکسیداز به روش Kovacs (1956)، هوازی یا بی‌هوازی بودن به روش Hugh & Leifson (1953)، فوق حساسیت در توتون به روش Klement *et al.* (1969) و حلالیت در پتاس ۳٪ به روش Suslow *et al.* (1982) انجام شد.

مقایسه بیماریزایی استرین‌های باکتریایی

تعداد پنج استرین به عنوان نماینده مناطق مختلف استان همدان بر مبنای الگوی پروتئینی و آزمون اثبات بیماریزایی برای بررسی‌های مقایسه‌ای در شرایط گلخانه انتخاب شدند. آزمون مقایسه بیماری‌زایی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلخانه انجام شد. برای هر استرین چهار گلدان و به همین تعداد گلدان نیز به عنوان گیاه شاهد اختصاص یافت. پس از رسیدن بوته‌ها به مرحله ۳-۴ برگی در هر گلدان ۵ بوته باقی گذاشته شد و اقدام به آلوده‌سازی بوته‌ها گردید (Samac *et al.*, 1998). پس از گذشت ۴۵ روز و ظهور علائم بیماری، طول ساقه، طول ریشه، وزن تر و وزن خشک بوته‌های

الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی در تعیین شباهت‌ها و تفاوت‌های استرین‌های باکتریایی در گزارش Field & Wills (1998) نوشته شده است و این بررسی نشان داد که غالب استرین‌های *C. m. subsp. insidiosus* جدا شده از مزارع یونجه استان همدان یکسان هستند.

ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های بررسی شده

نتایج آزمون‌های فنوتیپی استرین‌های *C. m. subsp. insidiosus* در جدول ۱ نوشته شده است.

جدول ۱- ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های *Clavibacter michiganensis subsp. insidiosus* عامل پژمردگی یونجه در استان همدان

واکنش	آزمون
-	کاتالاز
+	رشد هوازی یا بی‌هوازی
+	هیدرولیز اسکولین
+	رشد در محیط حاوی TTC
-	اکسیداز
-	لوان
-	اوره‌آز
-	هیدرولیز نشاسته
-	تولید اسید از ریبوز
-	تولید اسید از سوربیتول
-	تولید اسید از اینولین
-	استفاده از فورمات
-	استفاده از استات
-	هیدرولیز کازئین
+	واکنش گرم

+ : بیش از ۸۰٪ استرین‌ها واکنش نشان دادند.

- : بیش از ۸۰٪ استرین‌ها واکنش نشان ندادند.

سلسیوس به مدت ۲ ساعت هضم و در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. برای تجزیه و تحلیل باندهای حاصل از آزمون بالا از نرم‌افزار NTSYS V.2.2 روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه Jaccard استفاده شد.

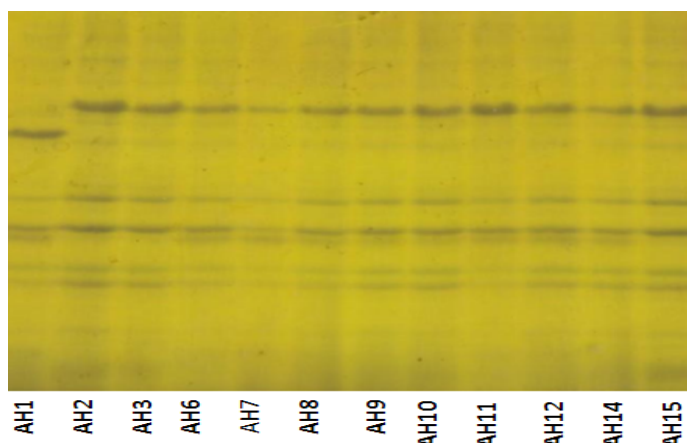
نتایج و بحث

جداسازی استرین‌ها

از نمونه‌های گردآوری شده از مناطق مختلف کشت یونجه در استان همدان پس از انجام آزمون‌های فنوتیپی، ۱۲ استرین به تفکیک مناطق نمونه‌برداری برای بررسی‌های گلخانه‌ای و مولکولی انتخاب گردید. علائم در بوته‌های مشکوک به آلودگی با *C. m. subsp. insidiosus* مشابه گزارش Stuteville & Erwin (1990) بود. در گزارش Samac *et al.* (1998) به آشکار شدن بیماری پژمردگی باکتریایی یونجه در مزارع با سن بیش از سه سال تأکید شده است که مطابق با مشاهدات انجام شده در بررسی مزبور بود. هرچند قهوه‌ای شدن آوندها در بسیاری از منابع از جمله گزارش‌های بالا نوشته شده است ولی هنگام نمونه‌برداری قهوه‌ای شدن آوندها به ندرت و بیشتر در آوندهای بوته‌های با بیماری در مراحل پیشرفته مشاهده شد.

مقایسه پروتئین‌های محلول سلولی استرین‌ها

نقوش الکتروفورزی ۱۲ استرین‌های مورد بررسی در تعداد و محل قرارگیری باندها با یکدیگر مقایسه شدند. باندهای قوی و ضعیف به استثناء استرین AH1 که در یک باند اختلاف داشت، یکسان بودند (شکل ۱). اهمیت



شکل ۱- الگوی پروتئینی استرین‌های *Clavibacter michiganensis subsp. insidiosus* عامل پژمردگی یونجه در استان همدان

Samac *et al.* (1998) کاهش وزن خشک و تر بوته‌ها در اثر آلودگی به باکتری عامل پژمردگی نوشته شده است. این محققین دلیل ایجاد خسارت بیشتر روی وزن تر و وزن خشک گیاه را مربوط به ایجاد یک سد فیزیکی در برابر انتقال آب و مواد غذایی به بخش‌های هوایی ساقه توسط باکتری دانسته که در نتیجه عمل فتوسنتز و ماده سازی گیاه تا حد زیادی کاهش می‌یابد.

بررسی‌های مولکولی

نتیجه محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای تصادفی Opa-02, Opa-03, Opa-15, Opa-18, Opa-20, Opa-01, Opa-02, Opa-03, Opa-04, Opa-07, Opa-14, Opa-16, Opa-19 در ژل آگارز ۱/۵ در شکل ۳ نشان داده شده است. خوشه‌بندی باندهای حاصل از این بررسی توسط نرم‌افزار NTSYS V.2.2 و با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و با ضریب تشابه Jaccard انجام شد که در شکل ۴ نشان داده شده است. استرین‌های AH1 و AH3 دارای بیشترین تفاوت

بر مبنای ویژگی‌های فنوتیپی بررسی شده استرین‌های عامل بیماری پژمردگی یونجه به عنوان *C. m. subsp. insidiosus* شناسایی شدند که با ویژگی‌های ثبت شده توسط Schaad *et al.* (2001) مطابقت دارد.

مقایسه بیماریزایی استرین‌های باکتریایی

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به خسارت استرین‌های *C. m. subsp. insidiosus* روی طول ریشه و ساقه، وزن تر و خشک یونجه در جدول ۲ نوشته شده و نمودار آن در شکل ۲ نشان داده شده است. به طور کلی وزن خشک بوته‌ها بیشترین خسارت را توسط استرین‌های مختلف *C. m. subsp. insidiosus* متحمل شد و پس از آن وزن تر بیشترین میزان کاهش را نشان داد. برخی از استرین‌ها خسارت بیشتری را روی طول ساقه و برخی خسارت بیشتری را روی طول ریشه ایجاد کردند. استرین‌های AH7، AH11 و AH14 که به ترتیب از شهرستان‌های فامنین، ملایر و نهاوند جدا شده بودند، بیشترین خسارت را ایجاد کردند. در گزارش

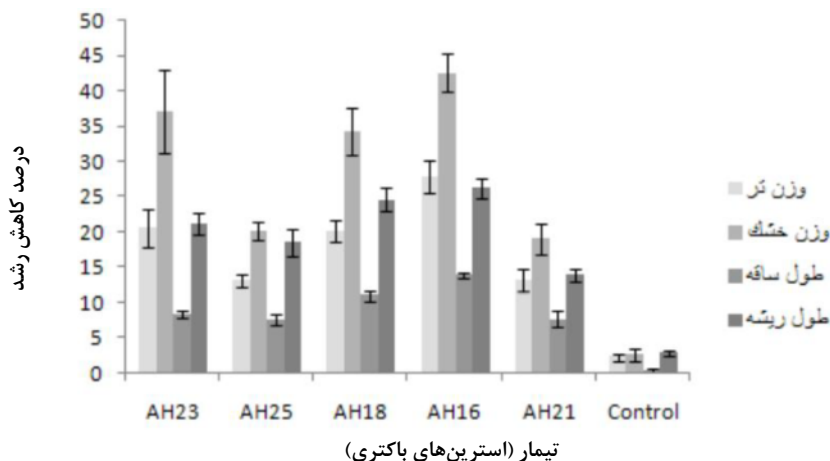
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر استرین‌های *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*

عامل پژمردگی یونجه در استان همدان روی طول ساقه و ریشه، وزن تر و خشک یونجه

F	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	درجه آزادی (df)	منبع تغییرات (SOV)
۳۳/۹۹	۱۲۹۶/۳۹	۲۹۸۱۶/۹۷	۲۳	تیمار
	۳۸/۱۴	۲۷۴۶/۱۲	۷۲	خطا
		۳۲۵۶۳/۱	۹۵	کل

در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار است.

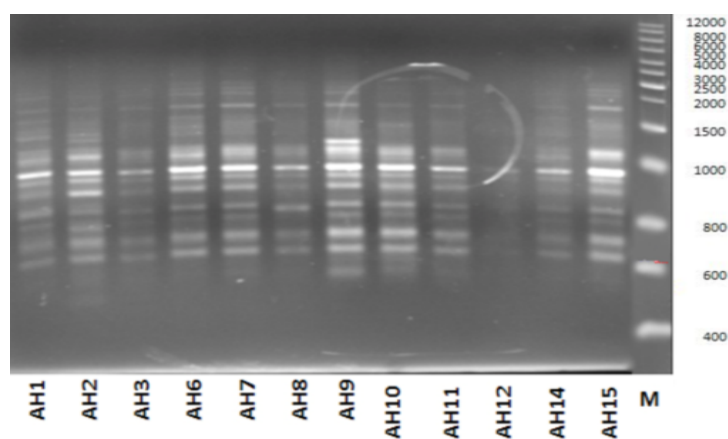
ضریب تغییرات (CV) ۱۸/۶۴ است.



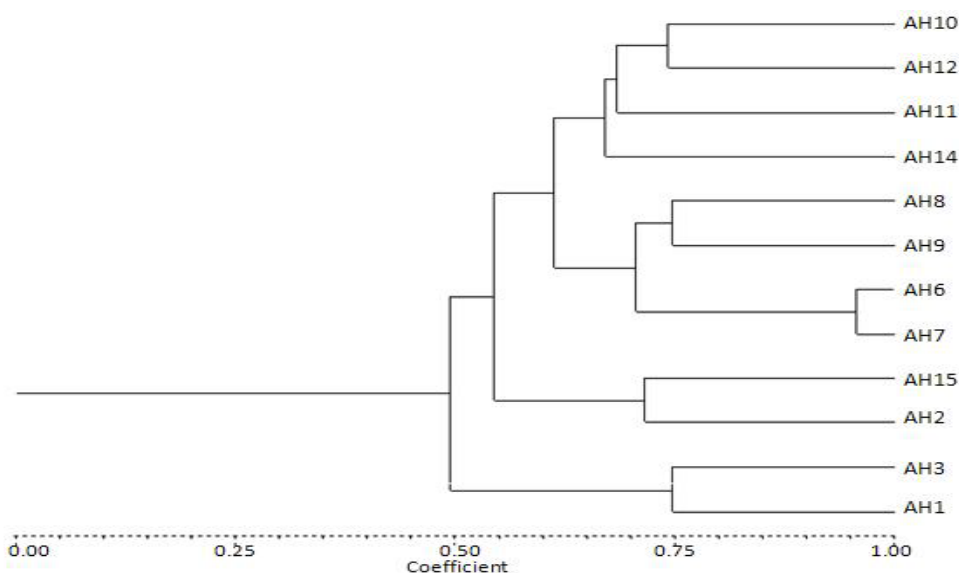
تیمار (استرین‌های باکتری)

شکل ۲- مقایسه اثر استرین‌های *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*

روی طول ساقه، ریشه، وزن تر و خشک یونجه پس از گذشت ۴۵ روز



شکل ۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمرهای تصادفی Opa-03، Opa-15، Opa-10، Opb-10، Opb-15، Opb-18، Opb-20، Ope-01، Ope-02، Ope-03، Ope-04، Ope-07، Ope-14، Ope-16، Ope-19 و Ope-19 در استرین‌های *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* عامل بیماری پژمردگی یونجه در استان همدان

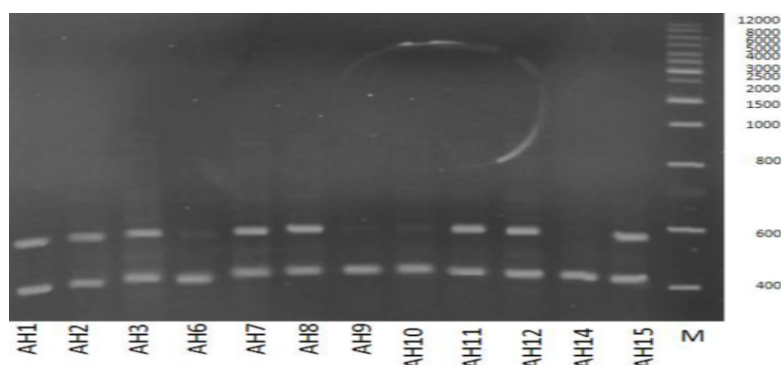


شکل ۴- خوشه‌بندی باندهای حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط پرایمر تصادفی Ope02 در استرین‌های *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* عامل بیماری پژمردگی یونجه در استان همدان

در استان همدان تنوع ژنتیکی زیادی را نشان دادند، برای مثال استرین‌های AH14 و AH15 که از شهرستان نهاوند گردآوری شدند، در خوشه‌بندی در دو شاخه کاملاً دور از هم قرار گرفته‌اند.

نتایج استفاده از پرایمرهای CIRS-1 و CIRS-2 در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و هضم محصول آن با آنزیم *EcoRI* برای بررسی تنوع استرین‌های مورد بررسی در شکل ۵ نشان داده شده است. بر این مبنا استرین‌های مورد بررسی دو گروه یکسان بودند که استرین‌های AH1، AH2، AH3، AH7، AH8، AH11، AH12 و

ژنتیکی آشکار شده توسط روش RAPD بودند. بر مبنای این روش استرین‌های مورد بررسی چهار کلاستر تشکیل دادند. استرین‌های AH7، AH8، AH9 و AH6 در یک کلاستر، AH15 و AH2 در کلاستر دوم، AH10، AH11، AH12 و AH14 در کلاستر سوم و AH1 و AH3 در کلاستر چهارم قرار گرفتند. روش RAPD برای تعیین تنوع ژنتیکی زیرگونه‌های باکتری *Clavibacter michiganensis* توسط Burokiene et al. (2005) توصیه شده است. همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود، استرین‌های جدا شده از یک منطقه جغرافیایی



شکل ۵- باندهای حاصل از هضم قطعه تکثیر شده با پرایمرهای CIRS-1 و CIRS-2 توسط آنزیم *EcoRI* در استرین‌های *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* عامل بیماری پژمردگی یونجه در استان همدان

استان همدان برای اولین بار، تنوع بیماریزایی این استرین‌ها و توانایی ایجاد خسارت تا حدود ۶۰٪ روی گیاه یونجه نیز مشخص شد. با توجه به اهمیت این بیماری و میزان خسارت ایجادشده توسط آن، جمع‌آوری و بررسی استرین‌های بیشتری از این باکتری از مناطق مختلف کشور ضروری به نظر می‌رسد و شناسایی کانون‌های آلودگی لازمه جلوگیری از گسترش این بیماری است.

AH15 با داشتن دو باند در یک گروه و استرین‌های AH6، AH10 و AH14 با دارا بودن تنها یک باند گروه دوم را تشکیل دادند.

روش PCR-RFLP توسط Burokiene *et al.* (2005) برای تعیین تنوع استرین‌های باکتری *C. m. subsp. michiganensis* استفاده شده است. در این بررسی علاوه بر تعیین تنوع ژنتیکی استرین‌های *C. m. subsp. insidiosus* عامل بیماری پژمردگی باکتریایی یونجه در

REFERENCES

1. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (2002). *A compendium of methods from current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.
2. Babalola, O. (2003). Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 2, 710-713.
3. Burokiene, D., Pulawska, J. & Sobiczewski, P. (2005). Genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from Lithuania. *Phytopathology Poland*, 38, 79-90.
4. Collins, M. D. & Bradbury, J. F. (1986). Plant pathogenic species of *Corynebacterium*. In: V. H. A. Sneath, N. A. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt, (Eds.), *Bergeys' manual of systematic bacteriology*. (pp. 1276-1283). Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
5. Dopfer, H., Stacketbrandt, E. & Fiedler, F. (1982). Nucleic acid hybridization studies on *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Agromyces* and related taxa. *Journal of Genetic and Microbiology*, 128, 1697-1708.
6. Felske, A., Vancanneyt, M., Kersters, K. & Akkermans, A. (1999). Application of temperature gradient gel electrophoresis in taxonomy of Coryneform bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49, 113-121.
7. Field, D. & Wills, C. (1998). Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae* and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States America*, 95: 1647-1652.
8. Henson, J. M. & French, R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 81-109.
9. Hugh, R. & Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 66, 24-26.
10. Klement, Z., Farkas, G. L. & Lovrekovich, L. (1963). Hypersensitive Reaction induced by phytopathogenic bacteria in the Tobacco leaf. *Phytopathology*, 54, 474-477.
11. Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas solanacearum* by the oxidase reaction. *Nature*, 178, 703.

12. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
13. McCulloch, L. (1925). *Aplanobacter insidiosum* new sp. The cause of alfalfa disease. *Phytopathology*, 15, 496-497.
14. Micheli, M. R., Bova, R., Pascale, E. D. & Ambrosio, E. (1994). Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Research*, 22, 1921-1922.
15. Samac, D. A., Nix, R. J. & Oleson, A. E. (1998). Transmission frequency of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* to alfalfa seed and identification of the bacterium by PCR. *Plant Disease*, 82, 1362-1367.
16. Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Minnesota: American Phythopatological Society Press. 373pp.
17. Suslow, T. V., Schroth, M. N. & Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72, 917-918.